

# 高等学校生物科目において酵素の競争的阻害現象とその応用を 学ぶための新しい観察・実験方法に関する研究

Studies on the Development of New Experimental Methods  
for Learning on the Competitive Inhibition of Enzymes  
in Upper Secondary School Biology Class

西野 秀昭      大野 航汰      青木 麻由

Hideaki NISHINO

Kota ONO

Mayu AOKI

福岡教育大学

福岡教育大学

山口県立

教職実践ユニット (理科)

教職大学院・大学院生

周南総合支援学校・高等部

(令和3年9月30日受付, 令和3年12月23日受理)

## 要 約

本研究では, 高等学校生物科目で学習する酵素の競争的阻害という現象を, 根拠に基づいて生徒が理解できるように構築された観察・実験の開発を目指している。新しい高等学校学習指導要領 (平成30年告示) 解説 理科編理数編によると, 探究活動の充実を通じて理科の目標の実現を図らなければならない。そこでこれまでとは異なり, 授業に導入可能な新しい観察・実験方法の確立が急務であるところから, 授業時間内に実施できる探究活動の構成を目指した。本研究で開発した実験方法は高校では実施困難な可能性がある内容も含まれるので, 大学等高等教育研究機関との密接な連携をとりながら, 高校生を主体とした探究活動が実施可能な提案を行っている。結果, 実験の環境が整っていない高校であっても, 大学等高等教育研究機関との連携によって, 高校生の科学的な探究活動を通じた学習で活用可能な実験方法を提案できたと考える。

**キーワード**      酵素, 基質, 競争的阻害, 高等学校, 大学等高等教育研究機関, 連携

## 1 目 的

酵素は有史以前から, 現在も, そしてこれからの将来も生活に密着して利用されるとともに, 生き物の体内での様々な化学反応を触媒することからも, 大切な生命現象として高等学校の生物基礎 (2単位) や生物 (4単位) (以降, 「高校生物科目」と呼ぶ) で取り扱われている。高等学校学習指導要領解説理科編理数編 (平成21年12月) では「生命の構造と機能・生命の多様性と共通性・生命の連続性」(文部科学省, 2009) で, 高等学校学習指導要領 (平成30年告示) 解説理科編理数編 (平成30年7月) (文部科学省, 2018) (以降, 解説) では「生物の構造と機能・生命の連続性」で, いずれでも採り上げられている。

しかし, その特徴的な働きを示すべき基質特異性に関する教科書での記述では, タンパク質加水分解 (「加水分解」は以降, 単に「分解」と呼ぶ) 酵素はタンパク質を分解する, デンプン分解酵素はデンプンを分解する, というような, 漠然とした, その名称から当たり前とも取れる, 生徒の興味や関心を引くとはとても思えない記述がなされている。このような酵素の扱いは, 生徒の興味・関心, 酵素に関して学ぶ意欲を喚起するには課題があると言わざるを得ない。

本研究では, 高校生物科目において, 酵素の競争的阻害という現象を科学的に探究するのに役立つ新しい実験方法の提案を行い, 生徒の興味・関心・学ぶ意欲を喚起する事を目的としている。高等学校の生物 (4

単位)では、「酵素としてはたらくタンパク質」の単位で、「酵素は、どのような特徴をもつのだろうか?」という課題に対して、基質特異性や補酵素の必要性などの他、酵素反応の競争的阻害が挙げられている。この競争的阻害 (competitive inhibition) の説明では、阻害剤が基質結合部位を占めることによる阻害と説明されている。しかし実際は、基質によく似た化合物による基質結合部位への結合が、本来の基質の結合を邪魔することが競争的阻害の定義であり、そのことが省略されているため、最初からの「阻害物質」との呼び名が、基質結合部位への「競争現象の結果」であることが理解できない説明になっている。本研究では、この酵素の競争的阻害という現象を、根拠に基づいて理解につながるよう構築した観察・実験を提案する。本研究で開発した方法は高校では実施困難な可能性がある実験も一部含まれる。そこで、大学等高等教育研究機関との密接な連携をとりながら、高校生でも探究活動において実施可能な実験方法及び大学等高等教育研究機関との密接な連携の在り方も提案した。結果、実験の環境が整っていない高校であっても、大学等高等教育研究機関との連携によって、高校生の科学的な探究を通じた学習で活用可能な実験方法を提案できたと考える。本研究では、酵素の競争的阻害という現象を、根拠に基づいて理解につながるよう構築した思考実験方法として紹介する。

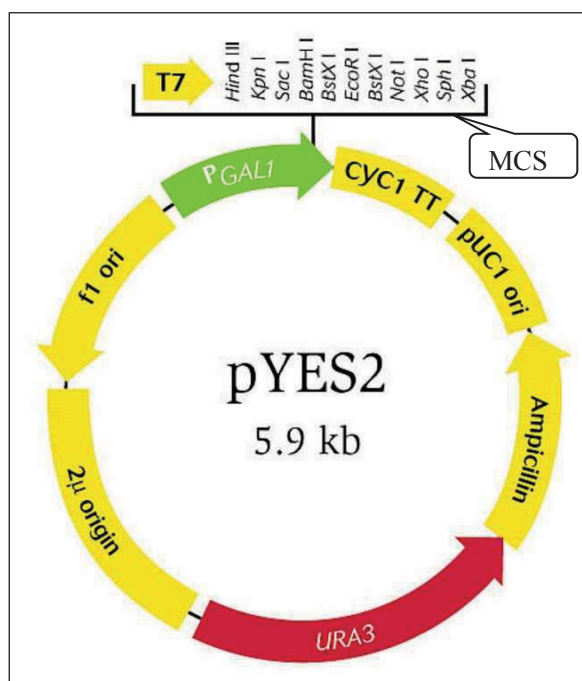


図1 pYES2 ベクター

MCS (multiple cloning site) の *EcoR* I と *Not* I の間に *hDHCR7* の読み枠を組換えたもの (Nishi 他, 2000) を本研究で用いた。〔Thermo Fisher Scientific 社のホームページ (HP) より引用〕 kb: キロ ( $10^3$ ) 塩基対

## 2 材料と方法

**基質 DNA:** 本研究で用いたプラスミドは、定法の一つ (Sambrook & Russell, 1.32-1.34, 2001) に従って、いずれも大腸菌株 *DH5a* を形質転換し、選択培地上の *DH5a* コロニーを培養・増殖させることで増幅し、プラスミド調製用キット (QIAprep Spin Miniprep kit, QIAGEN) を用いて精製した。先行研究 (Nishi 他, 2000) にてクローニングされ、塩基配列決定等の解析も既に終わっているヒト *sterolΔ7-reductase* cDNA (*hDHCR7*) を組換えた pYES2 ベクター (大腸菌と酵母のシャトルベクター) を用いた (図1は cDNA 挿入前の pYES2 ベクターの構造図)。このような、構造解析が終了したベクターなどの組換え DNA は、大学等高等教育研究機関に依頼して高大連携を図ることで利用が可能である。大学側も高大連携を進める必要があるため、遠慮無く申し込んで頂きたい。例えば福岡教育大学では、ホームページで連携可能なリソースで

ある「福岡教育大学研究シーズ集」を公開している。各高等教育研究機関のこのようなリソースを高等学校で活用することをお薦めする。

*hDHCR7*は、その開始コドンから終止コドンまでの読み取り枠〔1,377bp (bp: base pairs, 塩基対)〕が、pYES2 ベクターのマルチプルクロニングサイト (MCS) の5'側が *EcoR* I、3'側が *Not* Iによって切り出すことが可能な範囲に挿入されている。従って、*hDHCR7*を切り出す制限酵素の名称を使って、呼びやすいようにこの組換えベクターを、以降は pEcoNot (ペコノット) と略称することにする。

また、制限酵素の競争的阻害実験に用いる、「阻害剤」に相当するものとして、高等学校でよく使われている「pGLO バクテリア遺伝子組換えキット」(BIO-RAD 社)に含まれている、緑蛍光タンパク質 (GFP) の L-アラビノースによる遺伝子発現の学習に用いるプラスミドである pGLO を用いた ([https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/japan/japanese/literature/M4119\\_Kit\\_1.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/japan/japanese/literature/M4119_Kit_1.pdf))。pGLO には、*EcoR*I によって認識・切断される塩基配列はあるが、*Not*I によって切断される塩基配列は無い (図2の pGLO の制限酵素マップ参照)。

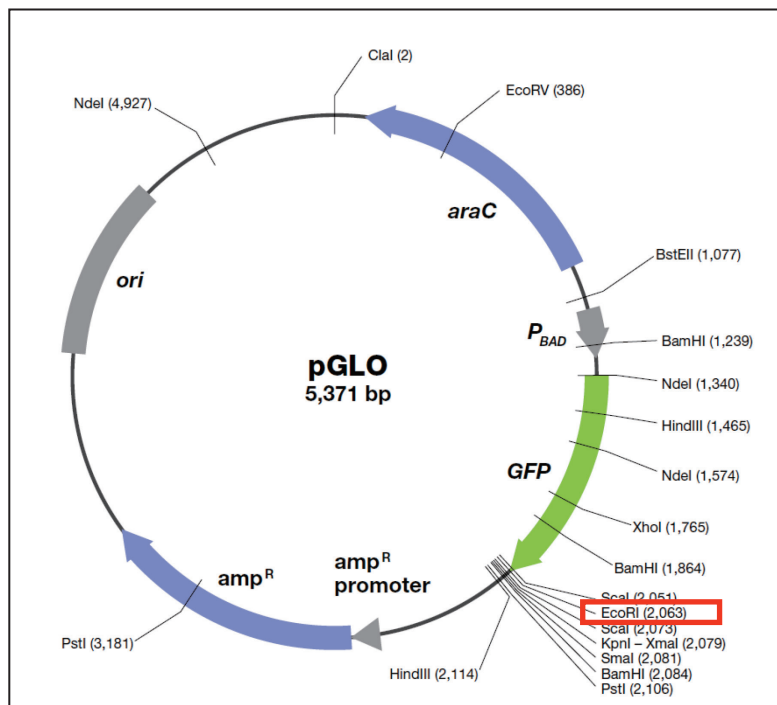


図2 pGLO には *Not*I の認識塩基配列が無い

pGLO には *EcoR*I の認識配列はある〔*EcoR*I (2,063) が、赤枠内〕、*Not*I の認識配列は見出せない。〔図は BIO-RAD 社のホームページより引用〕

**制限酵素:** *EcoR* I と *Not* I (いずれも、TaKaRa バイオ株式会社、以降、TaKaRa 社) を採り上げた。pEcoNot に両酵素を同時に使う (double-digestion) と、1.4 kb ほどの DNA (*hDHCR7*) が切り出される。pYES2 は 5.9 kb ほどなので、アガロースゲル電気泳動後の染色では 1.4 kb の DNA とは区別が可能である (結果と考察の図3参照)。

**アガロースゲル電気泳動:** 電気泳動槽は、Mupid-2plus (ADVANCE) を用いた。アガロース濃度は 0.8% でミニゲルに作成し、0.5×TBE 中でアガロースゲル末端から 2 cm ほどまで電気泳動を行った。染色は、電気泳動終了後、臭化エチジウム 0.5 μg/mL 0.5×TBE (Sambrook & Russell, 5.11, 2001) で 10 分ほど染色し、トランスイルミネーター上で観察した。写真撮影は、ミニゲル全体にフードカバーをかけ、デジタルカメラのモノクローム様式で行った。また、DNA の染色には近年、臭化エチジウムに替わる、安全性の

高さを謳った、先染めで用いるアガロースゲル電気泳動用蛍光染色試薬（例えば、ミドリグリーン Direct, <https://www.n-genetics.com/products/1072/1023/13219.pdf>）も販売されている。泳動位置の変化などの注意点を抑えれば利用は可能である。

### 3 結果と考察

制限酵素処理は表1に示すように行った。表の番号は、図3以降に示すレーンの番号に対応している。pEcoNot は、制限酵素 *EcoR* I と *Not* I の同時処理によって 1.4 kb と 5.9 kb の DNA が検出される（図3、レーン5参照）。

表1 制限酵素反応液の調製

レーン番号	2	3	4	5	6
<i>EcoR</i> I	—	—	—	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
<i>Not</i> I	—	—	—	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
10 $\times$ H buffer <sup>#</sup>	2.0 $\mu$ L				
0.1% BSA	2.0 $\mu$ L				
0.1% Triton X-100	2.0 $\mu$ L				
pEcoNot*	—	5.0 $\mu$ L	5.0 $\mu$ L	5.0 $\mu$ L	5.0 $\mu$ L
pGLO*	5.0 $\mu$ L	—	5.0 $\mu$ L	—	5.0 $\mu$ L
滅菌精製水	9.0 $\mu$ L	9.0 $\mu$ L	4.0 $\mu$ L	8.0 $\mu$ L	3.0 $\mu$ L
total	20 $\mu$ L				

全て、1.5mL マイクロチューブに調製した。0.1% BSA と 0.1% Triton X-100 は、*Not* I の活性を 100% 引き出すのに必要である。これらの添加物は、*EcoR* I の活性には影響しないことは確認している。制限酵素反応は 37°C で 10 分間行った。反応の停止は、制限酵素に添付されている 10 $\times$  Loading buffer (1% SDS, 50% Glycerol, 0.05% Bromophenol Blue) を 4  $\mu$ L 加えて行った。その後すぐにアガロースゲル (0.8%, 0.5 $\times$ TBE) 電気泳動を行った。# : *EcoR* I と *Not* I の働きを最大限にするは、この緩衝液が最適とされている。組成は、500 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, 1000 mM NaCl (制限酵素の添付書類による)。表で省略されている番号1は、1kb DNA ladder を泳動させた。DNA の大きさの判断基準とする。\* : pEcoNot, pGLO とも、1.0  $\mu$ g ずつ使った。

制限酵素反応液は表1のように調製した。高校生が調製する場合は、0.5  $\mu$ L をマイクロピペットで分取するのが困難な場合は、プラスミド以外を事前に混合したものを準備しておいても良いだろう。その際は、冷蔵保存可能な時間を予め調べておく必要があることに注意する。

酵素反応は 37°C で 10 分間行った。アガロースゲル電気泳動の結果を図3に示す。pGLO で 2 本（レーン2）、pEcoNot（レーン3）で 3 本のバンドが観察できる。制限酵素処理でいずれも 1 本のバンドになることから、凝集か、鎖状になっていると考えられる。この事を本研究では利用している。pEcoNot と pGLO のバンドが全て大きさに違いがあるので、両者を混合すると、5 本のバンドが観察できる（レーン4）。pEcoNot を制限酵素 *EcoR*I と *Not*I で処理すると、MCS の *EcoR*I と *Not*I の間に組込まれている 1.4 kb の大きさのバンドと、pYES2 ベクターの 5.9 kb ほどのバンドの 2 本が観察された（レーン5）。つまり、レーン3の大きい方のバンド三本 (a, b, d) が消え、新たなバンド二本 (e, f) が出現しているのが分かる。そこで、pEcoNot と pGLO とも混合してレーン5と同じ条件で処理すると、レーン5では消えていた大きいバンドのうち一本 (b) が残っており、同じくレーン5では観察できなかった d のバンドも残っているのが観察されている。

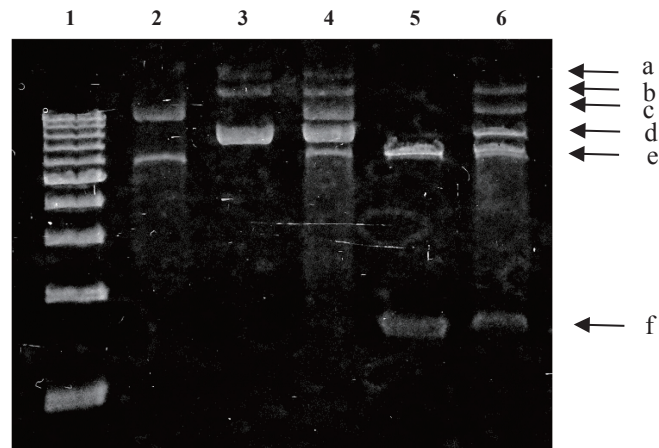


図3 pEcoNot と pGLO のアガロースゲル電気泳動

レーン1は、1kb DNA ladder である。下から、1kb, 2kb, 3kb, …の大きさの DNA である。レーン2: pGLO; レーン3: pEcoNot; レーン4: pGLO + pEcoNot; レーン5: pEcoNot を *EcoRI* + *NotI* で処理; レーン6: pGLO + pEcoNot を *EcoRI* + *NotI* で処理。処理条件は附録表1を参照。バンド a, b は、バンド d のプラスミド pEcoNot (レーン3) が、またバンド c はバンド e のプラスミド pGLO (レーン2) が、それぞれ大腸菌内で複製される際に形成されたコンカテマープラスミドであると考えられる。(Viret, et al, 1991)

これらの結果から、表1の実験条件の下で、pGLO を塩基配列不明の DNA 二重らせん構造として例えばここでは DNA-X と名称を変える。そして次の、【『競争的阻害』の考え方を導かせる思考実験の過程】の手順①～⑥のように、思考実験の過程を高校生物の授業で組む事も可能と思われる。

#### 【『競争的阻害』の考え方を導かせる思考実験の過程】

① 閉環した DNA 二重らせん構造のプラスミドである pEcoNot には、制限酵素の *EcoRI* と *NotI* によって切断される塩基配列があることを、図1と同じ情報で示す。

塩基配列が不明な、閉環した DNA 二重らせん構造である DNA-X (レーン2) と、全塩基配列が分かっている pEcoNot (レーン3) をアガロースゲル電気泳動すると、図4のようになった事を示す。DNA-X で2本 (レーン2)、pEcoNot で3本 (レーン3) の、それぞれ移動度 (DNA としての大きさ, bp) が異なるバンドが観察できる。レーン1は、下から1 kb, 2 kb, 3 kb, …という1 kbの大きさ違いの DNA の混合物で、DNA の大きさの判断基準に用いる1 kb DNA ladder である。

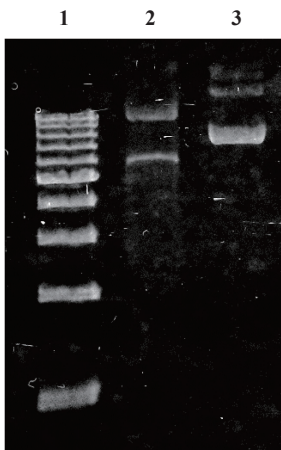


図4 pEcoNot と DNA-X のアガロースゲル電気泳動

レーン1は1kb DNA ladder で、下から1kb, 2kb, 3kb, …の大きさの DNA である。レーン2は塩基配列が不明の DNA 二重らせん構造である DNA-X, レーン3は pEcoNot である。

② DNA-X と pGLO のバンドが全て大きさに違いがあるので、両者を混合すると、5本のバンドが観察できる (図5, レーン4)。レーン2, 3, 4の各バンドに大きさ順に記号 a, b, c, d, e を付す。

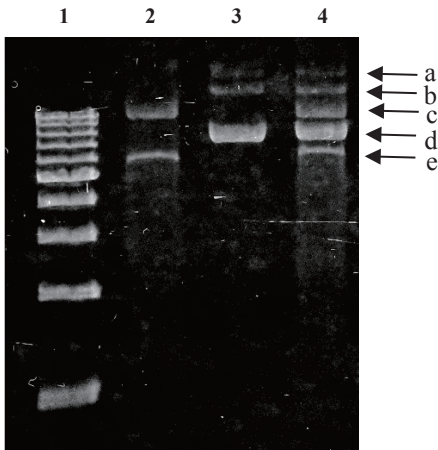


図5 pEcoNot と DNA-X を合わせたアガロースゲル電気泳動

レーン4は、pEcoNot と DNA-X を混合して電気泳動を行った。

③ pEcoNot を制限酵素 *EcoRI* と *NotI* で処理すると、予想通り 1.4 kb の大きさのバンドと、5.9 kb ほどのバンドの2本が観察された (図6, レーン5)。つまり、レーン3のバンド三本 (a, b, d) が消え、新たなバンド二本 (e, f) が出現しているのが分かる。

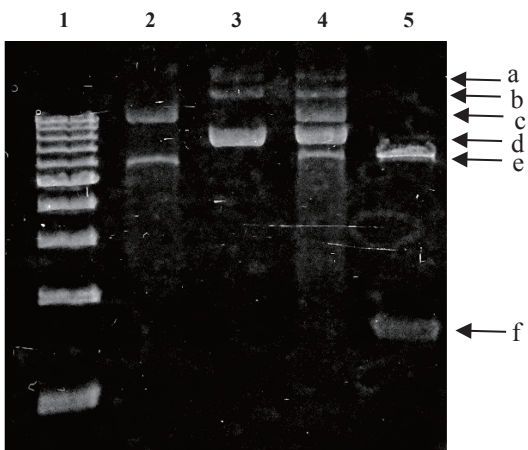


図6 pEcoNot を *EcoRI* と *NotI* で処理した後のアガロースゲル電気泳動

レーン4は、pEcoNot と DNA-X を合わせてアガロースゲル電気泳動を行った (図3の再掲)。

④ pEcoNot と pGLO を混合してレーン 5 と同じ条件で制限酵素処理したところ、レーン 5 では消えていた大きいバンドのうち一本 (b) が残っており、同じくレーン 5 では観察できなかった d のバンドが観察されている (図 7, レーン 6)。

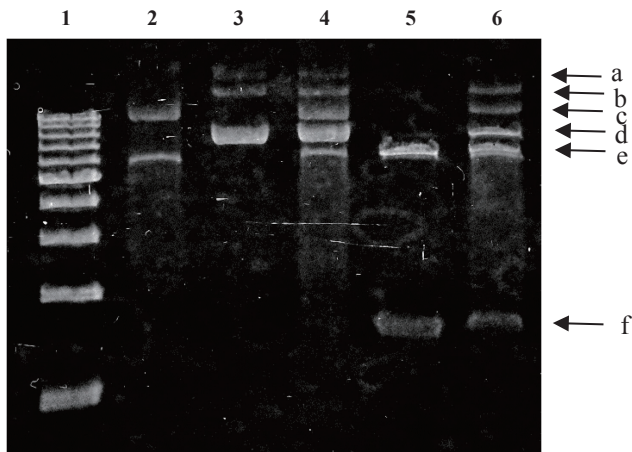


図 7 pEcoNot と DNA-X を混合して *EcoRI* と *NotI* で処理した後のアガロースゲル電気泳動

⑤ 図 7 の「レーン 6 では何故、レーン 3 の未処理の pEcoNot で観察された b と d が観察されたのだろうか?」との問いに対して、生徒が予想を立てる。

⑥ 生徒の予想状況を見て、DNA-X の正体を、図 2 を用いて DNA-X には *NotI* が切断する塩基配列は無いが、*EcoRI* が切断する箇所はあることを示す。これによって予想を、根拠を持った状態で再構成させる。即ち、*EcoRI* が認識する塩基配列が pEcoNot にも DNA-X にも存在することから、*EcoRI* の決まった量の働きを、pEcoNot と DNA-X が「競争的」に奪い合った結果、図 7 のレーン 6 のような、*EcoRI* による pEcoNot の切断が不十分のような結果となったとの予想を立てさせる。さらに予想を発展させて、*EcoRI* の働きがもっと多かたり、反応時間が長かたりすると、b や d のバンドは消えるのではないかと、の見通しを持った予想を展開させる事も可能であろう。このような思考の発展から、薬などの効果への応用なども考察させる。

また、DNA-X、即ち pGLO のみ *EcoRI* と *NotI* で処理するとどのような電気泳動のパターンになるのか気になる生徒もいることだろう。実験をする際に、コントロール (対照) をしっかり取ることを学ばせる事が大切である。その一方で、pGLO のみを *EcoRI* と *NotI* で処理した時のパターンが図 6 のレーン 6 のパターンに影響していないのか調べたくなるはずで、そのような探究心を持たせるため、表 1 では pGLO のみでの制限酵素処理はしていない (解説の「課題解決の振り返り」に相当)。実はその結果は、図 6 のレーン 6 にもう見えていて、e のバンドは実は 2 本あり、e の上のバンドが pEcoNot 由来、下のバンドが pGLO 由来ではないかと、生徒が予想を立てることが可能と考えられる。このように、生徒の気づきを引き起こさせる手立てを高校生物の探究的な観察・実験に導入する効果も今後検証する価値があると考えられる。

DNA-X、即ち pGLO の濃度に依存して pEcoNot の分解が減っていくことを観察できる、用量依存性 (dose-dependent) な実験も検討してみた。しかし再現性よく実験結果を出すことが難しく、高校への導入案は現段階では断念している。「DNA-X の量を増やしていくとどうなるのか?」との疑問が生徒から出たら、放課後にでも実験する機会を与えると、能動的な学びが得られるものとする。

DNA の染色には近年、臭化エチジウムに替わる、安全性をうたったアガロースゲル電気泳動用蛍光染色試薬 (例えば、ミドリグリーン Direct, <https://www.n-genetics.com/products/1072/1023/13219.pdf>) も販売されている。電気泳動の前にサンプルに混合して使用する。ただ、高価なものと室温では 1 年間しか保管で

きないこと、DNAの量が少なくなると、電気泳動での移動度が遅くなることがあるので、DNAの大きさを比べる場合は注意が必要である（ミドリグリーン Direct の説明書参照）。

#### 4 まとめ

本研究で示した実験内容を適用すると、酵素の基質特異性という性質を、競争的阻害という現象を通じて高校生が実感できる探究活動を組み上げる事も可能と考えられる。プラスミドの増幅や制限酵素処理、アガロースゲル電気泳動等の実験は、遺伝子組換え実験実施のための委員会を設置している大学等の高等教育機関に委託し、そのことを生徒には知らせた上でデータのみを活用することも可能だろう。このような思考実験を通じて、変異導入実験などと共に、酵素の基質特異性の厳密さを高校生が実感をもって学ぶことが可能になるだろう。今後、COVID-19の状況が落ち着きを見せたら、高校生への実践研究を経てその有効性を確認していきたい。

#### 参考文献

- ・ 文部科学省（2009），高等学校学習指導要領解説 理科編 理数編，実教出版
- ・ 文部科学省（2018），高等学校学習指導要領（平成30年告示）解説 理科編 理数編，実教出版
- ・ Nishi,S., Nishino, H., Ishibashi, T., (2000) Biochim. Biophys. Acta, 1490, 106-108
- ・ 西野秀昭（2021），高等学校生物科目において酵素の基質特異性を学ぶための新しい実験方法に関する研究，福岡教育大学紀要，第70巻，第3分冊，39 - 46
- ・ Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001), Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL, 3rd. ed., 1.32-1.34
- ・ Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001), Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL, 3rd. ed., 5.11
- ・ Viret,J.-F., Bravo, A., and Alonso, J.C., Microbiological Reviews, Dec. 675-683, 1991

#### 附記

本研究は、福岡教育大学令和3年度科研費獲得推進サポート経費の交付を受けて行えた成果である。感謝申し上げます。また、本研究で参照した全てのウェブサイトは、2021年9月30日時点でアクセス可能である事を確認している。

#### 本研究内容に関する問合せ先

西野 秀昭（にしの ひであき）

〒811-4192 福岡県宗像市赤間文教町1番1号 福岡教育大学・教職実践ユニット（理科）



e-mail: [hideakin-atmark-fukuoka-edu.ac.jp](mailto:hideakin-atmark-fukuoka-edu.ac.jp)  
researchmap:「西野秀昭」で検索

Tel 0940-35-1385（研究室直通）